

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-281584

(43)Date of publication of application : 10.10.2000

(51)Int.Cl.

A61K 35/78

A61P 37/04

A61P 43/00

(21)Application number : 11-084074

(71)Applicant : YAMANOUCHI PHARMACEUT CO
LTD

(22)Date of filing : 26.03.1999

(72)Inventor : YOSHIDA SATORU
KONISHI OKITSUGU

(54) NEUTROPHILE-ACTIVATING AGENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a neutrophile-activating agent from crude medicines having excellent effect as animal feed components.

SOLUTION: This neutrophile-activating agent is obtained by formulating four kinds of crude medicines comprising seed of Cucurbita moschata Duch., dried flower or seed of Carthamus tinctorius, Plantago asiatica and Lonicera japonica.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of
rejection][Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection][Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-281584
(P2000-281584A)

(43) 公開日 平成12年10月10日 (2000. 10. 10)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	W 4 C 0 8 8
A 6 1 P 37/04		31/00	6 3 7 C
43/00			6 4 3 D

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平11-84074

(22) 出願日 平成11年3月26日 (1999. 3. 26)

(71) 出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72) 発明者 吉田 哲

東京都板橋区蓮根3-17-1 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 小西 興亜

東京都板橋区蓮根3-17-1 山之内製薬株式会社内

(74) 代理人 100089200

弁理士 長井 省三 (外2名)

Fターム(参考) 4C088 AB12 AB19 AB22 AB26 BA37

CA03 MA07 MA41 NA05 ZB02

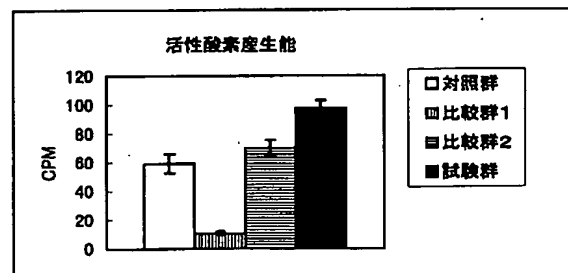
ZB35 ZC61

(54) 【発明の名称】 好中球活性化剤

(57) 【要約】

【課題】 優れた好中球活性化剤の創製。

【解決手段】 南瓜子、紅花、オオバコ及びビスイカズラの4種の生薬を配合することからなる好中球活性化剤



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 南瓜子、紅花、オオバコ及びスイカズラの 4 種の生薬を配合することからなる好中球活性化剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規な好中球活性化剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 好中球は、マクロファージとともに免疫応答のエフェクター相に働き、異物処理や殺菌を行う食細胞である。好中球とは顆粒白血球のうち中性顆粒をもつものであるが、その役割は主としてブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、緑膿菌、大腸菌などの細菌類を取り込んで殺菌することである。好中球は生体防御の中心をなす細胞で、細菌感染、真菌感染防御には必須である。好中球減少症、好中球の質的異常（慢性肉芽腫症等）では著明な易感染性が見られる。

【0003】 好中球の特徴的な機能として、遊走能、食能、殺菌能が挙げられる（免疫・アレルギー・リウマチ病学、第 2 版、医学書院発行）。

①遊走能

好中球は炎症病巣に向かって遊走する特性がある。好中球は、種々の化学物質に対するレセプターを持ち、濃度勾配に逆らって濃度の高い方へ移動する走化性を持つ。血管壁を通り抜けて炎症部に達し、その部の細菌や異物を貪食（摂食処理）する。

②貪食能

好中球は細胞表面に IgG-Fc レセプター、C3b レセプターを持ち、抗体や補体を結合した細菌などを効率よく取り込むことができる。その際、好中球が異物と接触すると細胞膜が活性化され、異物を取り込んで、膜が細胞内に反転して食胞を形成する。食胞はリソソームと融合してファゴリソソームとなり、顆粒中に含まれる酵素が放出されて、異物を消化ないし殺菌する。

③殺菌能

好中球の殺菌作用には、酸素依存性の機序と、酸素非依存性の機序がある。酸素依存性の機序には、NADPH オキシダーゼによって種々の活性酸素を生じる系と、ミエロペルオキシダーゼによって生じるハロゲン化ヒドロキシラジカルおよび一重項酸素によって殺菌効果が発揮されるものがある。酸素非依存性の機序として、ラクトフェリン、リゾチム、塩基性蛋白によるものがある。

【0004】 好中球の活性化に関与する生体内因子としては、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン 8（IL-8）、腫瘍壊死因子（TNF α ）等が知られている。しかし、これらの生体内因子以外では、ラクトフェリン、 β -グルカンの他、好中球活性化作用を有する化合物は報告されていない。まして生薬の好中球活性化作用に関しては、全く報告はない。

【0005】 国際公開第 95/34218 号には、南瓜子、オオバコ、スイカズラの 1 種以上（とりわけ 3 種の生薬）を飼料に添加することにより、寄生虫、細菌及びウイルス病の特に自然感染を防ぎ、生体防御力の強化と共に肉質、卵質を改善する旨が開示されている。更には、南瓜子、オオバコ、スイカズラ、紅花の 4 種の生薬を配合した飼料について採卵鶏の健康状態、生存率、卵質の向上、抗ロイコチゾン病効果が開示されている。

10 【0006】 特開昭 56-92820 号にはニホンカボチャ等のウリ科植物からインターフェロン誘起剤が抽出される旨が、特開昭 56-79623 号及び特開昭 56-97232 号には金銀花、車前子等からインターフェロン誘起剤が抽出され、ヒト及び動物のウイルス感染症の予防及び治療に有用である旨が各々記載されている。また、特開昭 57-32222 号にはペニバナから抽出したインターフェロン誘起剤の抗ウイルス活性及び抗腫瘍活性が開示され、抗腫瘍剤や生理作用改良、健康増進剤として有用である旨が記載されている。

20 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者は、動物飼料成分として優れた効果を有する、南瓜子、オオバコ、スイカズラ等の生薬の生理機能の解明及び更なる用途を見出すことを目的として、鋭意検討を重ねてきた。その結果、南瓜子、紅花、オオバコ及びスイカズラの 4 種の生薬の配合により、優れた好中球活性化作用が得られることを見出し、本発明を完成させた。

【0008】

【課題を解決する為の手段】 即ち、本発明は、南瓜、紅花、オオバコ及びスイカズラの 4 種の生薬を配合することからなる好中球活性化剤である。本発明の好中球活性化剤は、好中球の機能の内、遊走能を維持して殺菌能と貪食能を亢進させる点で、ラクトフェリンや β -グルカン等の従来の好中球活性化剤にはない優れた作用を特徴とする。本発明の好中球活性化剤は、古来から民間療法に使用されてその安全性は確認されている生薬の組合せであることから、ヒト又は動物の治療用医薬としてのみならず、予防薬或いは機能性食品、健康食品として長期に渡って常用するにはふさわしい。

40 【0009】 前述の各公開公報においては本発明の有効成分である各生薬についてインターフェロン誘起作用が開示されているが、好中球の活性化作用については何ら開示も示唆もない。また、前述の国際公開第 95/34218 号には、本発明の 4 種の生薬を配合した飼料について動物の寄生虫、細菌及びウイルスに対する感染防御剤としての効果は開示されているものの、好中球の活性化作用については開示も示唆もない。

【0010】

50 【発明の実施の形態】 以下、本発明を更に詳細に説明する。まず、本発明において使用される生薬について説明

する。南瓜子はウリ科の植物南瓜（和名：ニホンカボチャ *Cucurbita moschata* Duch.）の種子であるが、本発明においては本発明の目的を達成するその類縁植物の種子も含む。南瓜子は、生のまま使用してもよいが、乾燥品の方が医薬、健康食品として保存上好ましく、また、種皮のみを用いてもよい。成分としてククルピチン、タンパク質、ビタミン A、B₁、B₂、C を含み、またカロチン等も含まれている。紅花はキク科の植物紅花（*Carthamus tinctorius* L.）の管状花の乾燥したものであるが、本発明においては本発明の目的を達成するその類縁植物の種子も含む。成分としてはカルサミン、サフライエロー、リグナン、ステロールを含む。婦人病、冷え症、更年期障害などの血行障害の治療に用いる。

【0011】オオバコはオオバコ科の植物オオバコ（*Plantago asiatica* L.）であるが、本発明においては本発明の目的を達成するその類縁植物の種子も含む。成熟した種子（車前子）または全草（車前）が用いられる。成分としては多糖類、Plantenolic acid、コハク酸、アデニン、Aucubin、Plantaginin やビタミン A、B₁ 等を含む。生薬としてヒトにおいては消炎、利尿、止しゃ薬として用いられている。スイカズラはスイカズラ科のスイカズラ（*Lonicera japonica* Thunb.）であるが、本発明においては本発明の目的を達成するその類縁植物の種子も含む。花若しくは蕾（金銀花）、葉、茎或いは全草（忍冬）が用いられる。成分としては蠟様物質、イノシトール、タンニン、サポニン、ロニセリン等を含む。生薬としては、解熱、解毒、利尿、消炎薬として用いられている。

【0012】本発明の好中球活性化剤には配合生薬総量の内、南瓜子、紅花、オオバコ、スイカズラを各々 5～85% の範囲で含む。本発明ではこれらの生薬を原末或いは水又は有機溶媒抽出エキスとして用いることができる。即ち、原末、溶媒製剤、粉剤、成型剤、浸出剤等として用いる。有機溶媒としてはエタノール、アセトン等が用いられ、これらは水或いは 2 種以上の有機溶媒と混合して用いてもよい。抽出は生薬に対し数倍量の溶媒を加え常温乃至加温下に抽出或いは浸出を行う。また、生薬を原末として使用するとき、その生鮮、陰干し、或いは乾燥したものを細断或いは粉末として用いる。

【0013】本発明の好中球活性化剤、即ち上記生薬の組合せは、各種食品用素材として広く使用でき、その用途は食品素材として使用できるものであれば、いずれの食品でも良い。本発明の生薬の原末或いは水又は有機溶媒抽出エキスは、そのまま又は自体公知の方法で各種の形態にして健康食品、機能性食品（サプリメント）、医薬品として利用できる。

【0014】例えば、医薬品或いは機能性食品（サプリメント）は通常の製剤化方法により経口用の錠剤、散剤、細粒剤、カプセル剤、丸剤、シロップ剤として提供される。製剤化の為に、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、

緩衝剤、矯味剤、安定剤等を必要に応じて添加することもできる。少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウム、スターチ、タルクのような潤滑剤や繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、ラクトースのような安定化剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸のような溶解補助剤を含有してもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、寒天、ペクチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

【0015】また、本発明の有効成分である生薬に影響を与えない程度でカフェイン、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン B₁₂、ビタミン C、ピオチン、カルニチン、パントテン酸、及びニコチン酸とその誘導体などの水溶性ビタミン、ビタミン A、ビタミン E とその誘導体などの脂溶性ビタミン、タウリン、アルギニンなどのアミノ酸、生薬（甘草、蒲公英、魚腥草、菊花、人参、桂皮など）を配合することができる。経口投与の為の液体組成物は、製薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤を含有してもよい。

【0016】また、健康食品としては、飲料、或いはゼリー、ビスケット、クッキー、キャンディー等菓子の形態で提供することができる。本発明の生薬は、投与対象の年齢、性別等を考慮して個々の場合に依りて適宜決定されるが、通常、成人 1 日当たり生薬総量として 10 mg～5 g、好ましくは 50 mg～3 g を経口摂取することにより、重篤な副作用の恐れもなく、所望の好中球活性化作用が発揮できる。

【0017】

【実施例】以下の実施例は本発明を説明するものである。

40

実施例 1 養魚の鰾内好中球活性化試験

（供試魚）供試魚は、自家繁殖させた平均体重 7.8 g のテラピア（*Oreochromis niloticus*）を 1 ヶ月程度予備飼育し、試験水槽で 5 日間馴致したものを使用した。馴致期間及び実験期間中の飼育密度は 1 尾/水槽とした。実験期間中の飼育環境は水温 24.0～25.6℃、pH 6.50～7.28、溶存酸素量 5.50～7.89 ppm であった。実験期間を除き、市販のウナギ用の配合飼料を乾燥重量で 1 日当たり体重の 2% 程度になるよう、1 日 2 回給餌した。

(対照群及び試験部の設置) 馴致終了後、1群4尾とし、5日間に渡って、表1の添加物を加えた前述の配合飼料を毎日体重の2%重量になるよう1日2回給餌した。試験群である生薬混合物は南瓜子：紅花：オオバコ：スイカズラ＝5：3：1：3の比率で配合した。

【表1】

	飼料中の添加物（添加量は重量%）
対照群	—
比較群1	ラクトフェリン0.4%
比較群2	β-グルカン1%
試験群	生薬混合物0.2%

【0018】（好中球の分離）5日目の2回目の給餌後に、抗原として5mg/mlに調整した大腸菌死菌0.2mlを各個体の鰓内に注射した。24時間後に鰓内に浸出してきた細胞をHANKS(-)液で洗浄し回収した。回収した細胞浮遊液は、180×gで5分間遠心して沈殿した細胞をHANKS(-)液で再浮遊させた。

（浸出好中球数の測定）細胞浮遊液を10μl取り、同量の0.5%トリパンブルー・HANKS(-)溶液を混合し、血球計算板を用いて検鏡して細胞数を測定した。細胞が多い場合、HANKS(-)液で数倍希釈して検鏡した。

【0019】（活性酸素産生能の測定）HANKS(-)液で希*

	①遊走能 浸出好中球数 (×10 ⁴ cell/ml)	②殺菌能 活性酸素産生能 (CPM)	③食食能 食食指数
対照群	22.99±13.20	59.14±6.55	2.52±0.35
比較群1	4.82±1.05	10.64±1.39	*3.17±0.26
比較群2	10.85±3.95	*69.80±5.63	*3.82±0.89
試験群	23.82±4.38	*97.64±5.50	*3.59±0.49

*:有意差 p<0.05

【0021】①遊走能

本発明の配合生薬添加群である試験群は、鰓内浸出好中球数において対照群と同等であり、好中球機能の内、遊走能は維持されることが示された。一方、比較群1及び2の鰓内浸出好中球数は有意差は出なかったものの対照群より明らかに減少しており、好中球の遊走能の低下を示した。

②殺菌能

本発明の配合生薬添加群である試験群は、対照群の1.5倍以上の活性酸素産生能を示し、殺菌能において顕著に好中球機能を亢進することが確認された。一方、比較群ではグルカン添加群である比較群2が有意な活性化酸素産生能を示したが、ラクトフェリン添加群である比較群1は活性酸素産生能は対照群より劣る結果であり、殺菌能の低下を示した。

【0022】③食食能

本発明の配合生薬添加群である試験群、比較群1、2共に食食指数は対照群より有意に上昇しており、好中球機能の内、食食能の亢進が確認された。以上の実験から、本発明の配合生薬は遊走能を維持して殺菌能と食食能を

* 釈して5.0×10⁶ cells/mlに調整した細胞浮遊液を使用した。0.5mlガラスチューブに細胞浮遊液0.05ml、発光剤として2-エチル-6-フェニル-3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン(CLA)0.1ml、HBSS(-)液0.3mlを加え、化学発光測定器(日音医理工学研究所製NU-600 Shimazu Recorder U-135)にセットする。その後、細胞膜刺激剤としてフォーボル-12-ミリスチート-13-アセテート(PMA)0.05mlをマイクロシリリングにて注入する。この際、高圧に設定し、10分間測定を行った。

（食食能の測定）被食食物質として0.5mg/mlに調整したオプソニン化サイモサン0.3mlと5.0×10⁶ cells/mlの細胞浮遊液を等量混合し、25℃で30分間反応させた。反応は、インキュベーター内でマイクロチューブテータを用いて回転させながら行った。反応後、混合液0.3mlはスライドグラスに40×gで1分間遠心塗布を施し、塗布標本作製した。塗布標本はメイグリュンワルド・ギムザ染色を施し、検鏡して食食指数を算出した。食食指数は食食陽性細胞1個当たりのサイモサン取り込み数で表した。

【0020】結果を表2と図1に示す。

【表2】

亢進する点で、従来知られたラクトフェリンやβ-グルカゴンよりも優れた好中球活性化剤であることが確認された。

【0023】実施例2 顆粒剤

南瓜子5.0g、紅花3.0g、オオバコ1.0g、スイカズラ3.0gと乳糖67g及びデンプン16gを堅形混合機にて均一に混合し、先にハイドロキシプロピルセルロース2g、カプリン酸トリグリセライド5gを85%エタノール40gに溶解したものの練合溶媒とし、練合したのちバスケット型製粒機(スクリーン径1mm)にて造粒後、14メッシュ篩を通過させ乾燥後顆粒とする。上記成分とマンニト、ヒドロキシプロピルセルロース、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、アスパルテーム及び香料を均一に混合し、顆粒剤12包を得た。

【0024】

【発明の効果】本発明によれば、強力な好中球活性化剤が提供される。遊走能を維持して殺菌能と食食能を亢進させる点で従来にはない優れた好中球活性化剤である。

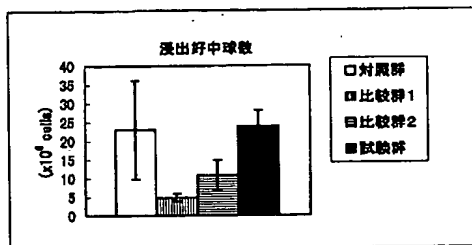
【図面の簡単な説明】

【図1】はティラピアの鰓内浸出好中球数を、

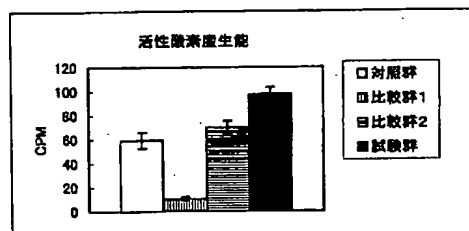
7
【図2】は活性酸素産生能を、

* * 【図3】は食食指数を表す。

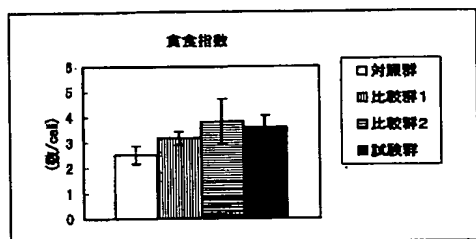
【図1】



【図2】



【図3】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.